

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2005年9月1日 (01.09.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/079847 A1(51) 国際特許分類⁷: A61K 45/00, 31/51, A61P 9/10, 43/00, G01N 33/15, 33/50

(KODAMA, Tatsuhiko) [JP/JP]; 〒1540002 東京都世田谷区下馬4-16-5 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/003008

(74) 代理人: 佐伯 勝生 (SAEKI, Norio); 〒1030027 東京都中央区日本橋三丁目15番8号アミノ酸会館ビル4階 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2005年2月24日 (24.02.2005)

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PII, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) 国際出願の言語: 日本語

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(26) 国際公開の言語: 日本語

(70) 優先権データ: 60/547,075 2004年2月25日 (25.02.2004) US

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 興和株式会社 (KOWA COMPANY, LTD.) [JP/JP]; 〒4608625 愛知県名古屋市中区錦三丁目6番29号 Aichi (JP). 日産化学工業株式会社 (NISSAN CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒1010054 東京都千代田区神田錦3丁目7-1 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 興梠 貴英 (KOHRO, Takahide) [JP/JP]; 〒1650031 東京都中野区上鷺宮2-2-19-303 Tokyo (JP). 柴崎 芳一 (SIBASAKI, Yoshikazu) [JP/JP]; 〒1130024 東京都文京区西片1-15-19-1104 Tokyo (JP). 浜窪 隆雄 (HAMAKUBO, Takaao) [JP/JP]; 〒2010003 東京都狛江市和泉本町3-19-1 Tokyo (JP). 児玉 龍彦

(73) 添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54) Title: NUCLEAR TRANSFER PROMOTER FOR Cdc42 PROTEIN AND METHOD OF SCREENING THE SAME

(54) 発明の名称: Cdc42タンパク質の核内移行促進剤及びそのスクリーニング方法

(57) Abstract: A nuclear transfer promoter for Cdc42 protein comprising an isoprenoid synthesis inhibitor and/or a geranylgeranyl transferase inhibitor such as an HMG-CoA synthase inhibitor, an HMG-CoA reductase inhibitor, an AMPK activator or a farnesyl pyrophosphoric acid synthase preparation; utilization thereof; a method therefor; a blood vessel remedy comprising the nuclear transfer promoter for Cdc42 protein as the active ingredient; and a method of screening a blood vessel remedy which comprises assaying the ability of Cdc42 protein to transfer into nucleus.

(57) 要約: 本発明は、HMG-CoA合成酵素阻害剤、HMG-CoA還元酵素阻害剤、AMPK活性化剤、ファルネシルピロリン酸合成酵素剤等のイソプレノイド合成阻害剤及び/又はゲラニルゲラニル転移酵素阻害剤からなるCdc42タンパク質の核内移行促進剤、その使用、その方法に関する。また、本発明は、Cdc42タンパク質の核内移行促進剤を有効成分とする血管治療剤及びCdc42タンパク質の核内移行能を測定することによる、血管治療剤のスクリーニング方法に関する。

WO 2005/079847 A1

明細書

Cdc42タンパク質の核内移行促進剤及びそのスクリーニング方法

技術分野

[0001] 本発明は、イソプレノイド合成阻害剤及び／又はゲラニルゲラニル転移酵素阻害剤、特にイソプレノイド合成阻害剤であるHMG-CoA還元酵素阻害剤が、Cdc42タンパク質の核内への移行を促進する作用を有することを見出したに基づくものである。即ち、本発明は、イソプレノイド合成阻害剤及び／又はゲラニルゲラニル転移酵素阻害剤、好ましくはイソプレノイド合成阻害剤、より好ましくはHMG-CoA還元酵素阻害剤からなるCdc42タンパク質の核内移行促進剤、同薬剤の核内移行促進剤としての使用、同薬剤を用いたCdc42タンパク質の核内移行を促進させる方法、同薬剤を含有してなる医薬組成物に関する。また、本発明は、当該Cdc42タンパク質の核内移行促進剤を有効成分とする血管治療剤、及びCdc42タンパク質の核内移行能を測定することによる血管治療剤のスクリーニング方法に関する。

背景技術

[0002] GTP結合タンパク質(Gタンパク質)は内在性のGTP加水分解活性をもつタンパク質の総称であり、mRNAの翻訳に関与するGタンパク質群、7回膜貫通型レセプターに共役する三量体Gタンパク質群、低分子量Gタンパク質群などが知られている(実験医学2003;21:137-145)。この内、低分子量Gタンパク質群はサブユニット構造をもたない分子量が2万～3万のタンパク質として、これまで100種類以上報告されており、イソプレニル化を受けた後に細胞膜に移行することで、GTP結合型(on)／GDP結合型(off)として細胞内シグナル伝達に関与している。

[0003] 低分子量Gタンパク質群は、さらに、Ras、Rho、Rab、Arf及びRanの五つのスーパーファミリーに分けられる(Physiol. Rev., 2001;81:153-208)。この内、Rhoファミリーは、Rho、Rac、Cdc42などのサブファミリーにさらに分けられる。Rhoファミリーはアクチン細胞骨格の再編成を介して細胞機能を制御し、Rasファミリーと同様に遺伝子発現の調節に関与している。そして、Rhoはアクチントレスファイバーや接着斑の、Racはラメリポディアの、Cdc42は糸状突起(フィロポディア)の形成を誘導する。

[0004] Rhoファミリーに属する低分子量Gタンパク質であるCdc42は、分子量21kDaのタンパク質で、糸状突起の形成、細胞接着、細胞運動、細胞極性、遺伝子発現の制御などの種々の細胞活動に関与するGタンパク質である。GTPと結合した活性型(GTP結合型)Cdc42の標的タンパク質としては、PAK (p21-activated kinase)、MRCK (myotonic dystrophy kinase-related Cdc42 binding kinase)、WAPS、及びIQGAP 1などが知られている。すなわち、Cdc42は、PAKの活性化によるMAPキナーゼカスケードを介して種々の遺伝子の発現を制御し、WASPやMRCKと関連して接着斑(focal contact)及び糸状突起(フィロポディア)の形成に関与し、またIQGAP1と関連して細胞間接着を制御している。

[0005] 一方、HMG-CoA(3-ヒドロキシ-3-メチル-グルタルリル-CoA)還元酵素阻害剤は、コレステロールの生合成における早期律速段階、すなわちHMG-CoAのメバロニ酸への転換を触媒する酵素の阻害剤であり、高コレステロール血症治療剤として知られている。HMG-CoA還元酵素阻害剤は、大規模試験において動脈硬化疾患の発症を低下させることができることが検証されているが、オーバーラップ解析などから、この発症低下には、肝臓においてHMG-CoA還元酵素を阻害することで発揮されるコレステロール低下作用とは別に、血管壁において発揮される作用が関与していることが示されてきている。

[0006] すなわち、HMG-CoA還元酵素阻害剤は、血管壁細胞においてHMG-CoA還元酵素を阻害しイソプレノイド生成の低下作用を介して低分子量Gタンパク質の活性を低下させ、細胞機能に様々な影響を及ぼし、血管壁において抗炎症反応を示すことで、動脈硬化を抑制すると考えられている。

[0007] さらに、HMG-CoA還元酵素阻害剤は、内皮細胞活性化の抑制、内皮機能の改善、単球/マクロファージの接着や泡沫化の抑制または改善、平滑筋の遊走・増殖の抑制、plaquesの安定化などの作用を有しているが、これらの作用には、Rhoサブファミリーの低分子量Gタンパク質であるRho、Rac、Cdc42が関与することが報告されている。特に、HMG-CoA還元酵素阻害剤の内皮機能改善効果は、服用開始後短期間で著明に発現し、諸作用の中で重要と考えられている。

[0008] 最近、血管壁におけるアンジオテンシンII、PDGF、トロンビン、エンドセリン、ロイコ

トリエンB4などが介在するシグナル伝達にRacが関与し、NADPHの活性を亢進して、血管病の進展に重要な役割を果たすことが明らかにされた(Am. J. Physiol. Cell Physiol., 2003;285:C723-734)が、Cdc42についても、血管内皮細胞の増殖及びバリア機能の回復(J. Cell Sci., 2001;114:1343-55、J. Biol. Chem., 2002;277:4003-9.、Circ. Res., 2004;94:159-166)、さらにエンドセリンのシグナル伝達(J. Biol. Chem., 2003;278:29890-900)に関与していることが報告されるようになった。

[0009] さらに本発明者らは、HMG-CoA還元酵素阻害剤であるピタバスタチンの血管内皮細胞における遺伝子発現に及ぼす影響を検討し、ピタバスタチンが炎症性サイトカインIL-8やMCP-1の発現、エンドセリンの発現、PAI-1の発現をそれぞれ抑制する一方、血管拡張・収縮に関するNOシンターゼの発現、凝固線溶系のトロンボモジュリンの発現を促進すること(J. Atheroscler. Thromb., 2002;9:178-183)、またPTX3(TFの発現を促進、動脈硬化進展の指標になる)の発現を抑制すること(J. Atheroscler. Thromb., 2004;11:62-183)を見出してきた。

発明の開示

[0010] 発明者らは、銳意研究の結果、驚くべきことに、イソプレノイド合成阻害剤及び／又はゲラニルゲラニル転移酵素阻害剤処理、特にHMG-CoA還元酵素阻害剤処理により、RacとCdc42が核内に移行することを見出し、本発明を完成した。

[0011] すなわち、本発明は、イソプレノイド合成阻害剤及び／又はゲラニルゲラニル転移酵素阻害剤、好ましくはイソプレノイド合成阻害剤、より好ましくはイソプレノイド合成阻害剤の1種であるHMG-CoA還元酵素阻害剤からなるCdc42タンパク質の核内移行促進剤に関する。

[0012] また本発明は、イソプレノイド合成阻害剤及び／又はゲラニルゲラニル転移酵素阻害剤の、好ましくはイソプレノイド合成阻害剤の、より好ましくはイソプレノイド合成阻害剤の1種であるHMG-CoA還元酵素阻害剤の、Cdc42タンパク質の核内移行促進剤としての使用に関し、またイソプレノイド合成阻害剤及び／又はゲラニルゲラニル転移酵素阻害剤を細胞に投与することからなる、Cdc42タンパク質の核内への移行を促進させる方法を提供する。

[0013] さらに本発明は、Cdc42タンパク質の核内移行促進剤を有効成分とする血管治療剤、Cdc42タンパク質の核内移行促進剤及び製薬上許容される担体を含有してなる血管治療用の医薬組成物を提供する。

[0014] また本発明は、Cdc42タンパク質の核内移行促進剤の血管治療剤の製造のための使用、及び治療・予防に必要な有効量のCdc42タンパク質の核内移行促進剤を血管障害の予防・治療を必要とする患者に投与することからなる血管障害の治療・予防方法を提供する。

[0015] さらに本発明は、Cdc42タンパク質の核内への移行を測定することを特徴とする血管治療剤のスクリーニング方法を提供する。より詳細には、Cdc42タンパク質を発現している細胞に被検物質を添加し、Cdc42タンパク質の核内への移行を測定することからなる、血管治療剤のスクリーニング方法を提供するものである。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]緑色蛍光タンパク質(GFP)とCdc42との融合タンパク質をコードする遺伝子を導入して、ピタバスタチンの非存在下で培養した形質転換細胞を蛍光顕微鏡で観察した写真である。

[図2]GFPとCdc42との融合タンパク質をコードする遺伝子を導入して、ピタバスタチンの存在下で培養した形質転換細胞を蛍光顕微鏡で観察したときの写真である。

[図3]GFPとCdc42との融合タンパク質をコードする遺伝子を導入して、ピタバスタチンの存在下で培養し、さらに核染色色素ヘキスト(Hoechst)を添加して核を染色(赤色)した形質転換細胞を蛍光顕微鏡で観察したときの写真である。

発明を実施するための最良の形態

[0017] 本発明者らは、HMG-CoA還元酵素阻害剤、特にピタバスタチンを用いて、HUVECにおけるCdc42タンパク質の挙動を測定した。そのために、Cdc42と蛍光タンパク質であるGFPとの融合タンパク質をコードする遺伝子をHUVECに導入し、GFP-Cdc42融合タンパク質が発現する形質転換細胞を調製した。この形質転換細胞を培養し、ピタバスタチンの有無による細胞内Cdc42の分布状態を、GFPによる蛍光として観察した。これらの結果を図1～図3に示す。

[0018] 図1は、ピタバスタチンの非存在下で培養した形質転換細胞におけるCdc42の分

布状態を蛍光顕微鏡で観察した結果を示す、図面に代わる写真である。図1ではGFPによる蛍光が細胞のほぼ全域にわたって観察でき、Cdc42タンパク質が形質転換細胞全域に分布していることが分かる。

[0019] 一方、ピタバスタチンの存在下で培養した形質転換細胞におけるCdc42の分布状態を蛍光顕微鏡で観察した結果を、図2として図面に代わる写真で示す。図2では、GFPによる蛍光が細胞のある箇所に局在していることが観察できる。このCdc42の細胞内局在位置をさらに確認するために、上記細胞をヘキスト(Hoechst) (Lydon M., et al., J. Cell Physiol., 102, 175-181 (1980); Sriram M., et al., Biochemistry, 31, 11823-11834 (1992))で染色した結果を、図3として図面に代わる写真で示す。図3では、ヘキストで染色された核が赤く観察されているが、これはGFPによる蛍光が局在化している部位と一致していた。

[0020] ここで使用したヘキストは、細胞膜透過性を有する蛍光色素であり、DNAの副溝のAT配列に特異的に結合するものである。以上の実験から、血管内皮細胞をピタバスタチンで処理すると、GFP-Cdc42が核染色色素ヘキストによる染色部位と同位置に、すなわち核に移行することが示された。この様に、HMG-CoA還元酵素阻害剤は、細胞内のCdc42タンパク質を核に移行させる作用を有していることが判明した。

[0021] 本発明のCdc42タンパク質の核内移行促進剤は、Cdc42タンパク質の関わる作用：細胞運動、細胞極性、細胞内シグナル伝達、遺伝子発現などの制御、特に血管壁細胞における遺伝子発現の制御に重要な影響を及ぼし、血管治療剤、特に内皮細胞機能改善剤、細胞接着阻害剤として有用であると考えられる。

[0022] 本発明におけるCdc42タンパク質の核内移行促進剤であるイソプレノイド合成阻害剤としては、HMG-CoA合成酵素阻害剤(Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1987;84:7488-92)、HMG-CoA還元酵素阻害剤、フィブラーート等のAMPK活性化剤(Biochem. Soc. Trans., 1997;25:S676)、N含有ビスホスホネート等のファルネシルピロリン酸合成酵素阻害剤(Biochem. Biophys. Res. Commun., 1999;264:108-111)などを挙げることができる。また、本発明におけるCdc42タンパク質の核内移行促進剤であるゲラニルゲラニル転移酵素阻害剤としては、公知の文献、例えばBiochemical Pharmacology 2000; 60:1061-1068等に記載されたものなどを挙げることができる。こ

これらの酵素阻害剤は、対象となる酵素の活性を完全に又は部分的に阻害することができる活性を有するものであればよい。

[0023] より具体的には、以下の化合物を挙げることができる。

ロバスタチン(化学名:(+)-(1S, 3R, 7S, 8S, 8aR)-1, 2, 3, 7, 8, 8a-ヘキサヒドロ-3, 7-ジメチル-8-[2-[(2R, 4R)-テトラヒドロ-4-ヒドロキシ-6-オキソ-2H-ピラン-2-イル]エチル]-1-ナフチル (S)-2-メチルブチレート(米国特許第4, 231, 938号参照));

シンバスタチン(化学名:(+)-(1S, 3R, 7S, 8S, 8aR)-1, 2, 3, 7, 8, 8a-ヘキサヒドロ-3, 7-ジメチル-8-[2-[(2R, 4R)-テトラヒドロ-4-ヒドロキシ-6-オキソ-2H-ピラン-2-イル]エチル]-1-ナフチル 2, 2-ジメチルブタノエート(米国特許第4, 444, 784号参照));

プラバスタチン(化学名:(+)-(3R, 5R)-3, 5-ジヒドロキシ-7-[(1S, 2S, 6S, 8S, 8aR)-6-ヒドロキシ-2-メチル-8-[(S)-2-メチルブチリルオキシ]-1, 2, 6, 7, 8, 8a-ヘキサヒドロ-1-ナフチル]ヘプタン酸(米国特許第4, 346, 227号参照));

フルバスタチン(化学名:(3RS, 5SR, 6E)-7-[3-(4-フルオロフェニル)-1-(1-メチルエチル)-1H-インドール-2-イル]-3, 5-ジヒドロキシ-6-ヘプテン酸(米国特許第5, 354, 772号参照));

アトルバスタチン(化学名:(3R, 5R)-7-[2-(4-フルオロフェニル)-5-イソプロピル-3-フェニル-4-フェニルカルバモイル-1H-ピロル-1-イル]-3, 5-ジヒドロキシヘプタン酸(米国特許第5, 273, 995号参照));

セリバスタチン(化学名:(3R, 5S)-エリスロ-(E)-7-[4-(4-フルオロフェニル)-2, 6-ジイソプロピル-5-メトキシメチル-ピリジン-3-イル]-3, 5-ジヒドロキシ-6-ヘプテン酸(米国特許第5, 177, 080号参照));

メバスタチン(化学名:(+)-(1S, 3R, 7S, 8S, 8aR)-1, 2, 3, 7, 8, 8a-ヘキサヒドロ-7-メチル-8-[2-[(2R, 4R)-テトラヒドロ-4-ヒドロキシ-6-オキソ-2H-ピラン-2-イル]エチル]-1-ナフチル (S)-2-メチルブチレート(米国特許第3, 983, 140号参照));

ロスバスタチン(化学名:7-[4-(4-フルオロフェニル)-6-イソプロピル-2-(N-メチル-N-メタンスルホニルアミノピリミジン)-5-イル]-(3R, 5S)-ジヒドロキシー(E)-6-ヘプテン酸(米国特許第5, 260, 440号、日本国特許第2, 648, 897号参照))
;

ピタバスタチン((3R, 5S, 6E)-7-[2-シクロプロピル-4-(4-フルオロフェニル)-3-キノリル]-3, 5-ジヒドロキシー-6-ヘプテン酸(米国特許第5, 856, 336号、日本国特許第2, 569, 746号参照))

これらは、製剤学的に必要であれば塩や溶媒和物として使用することもできる。特に好ましい阻害剤はピタバスタチンである。

[0024] また、もうひとつの本発明である、Cdc42タンパク質の核内移行を測定することを特徴とする血管治療剤のスクリーニング方法としては、Cdc42タンパク質を標識又は染色し、その核内移動を同定する方法などが挙げられる。Cdc42タンパク質を標識する方法としては、遺伝学工学的手法が挙げられる。具体的には、GFP(宮脇敦史:蛍光バイオイメージングで細胞内現象を可視化する。理研ニュース255:2002年9月)をはじめとする蛍光タンパク質BFP、CFP及びYFPなどを利用して、これらとCdc42タンパク質との融合タンパク質を利用する方法が挙げられる。また、Cdc42タンパク質を染色する方法としては、免疫学的手法などが挙げられる。具体的には、蛍光抗体又は酵素抗体の利用が挙げられる。特に、遺伝学工学的手法により、GFP等の蛍光タンパク質とCdc42タンパク質との融合タンパク質を用意し、該融合タンパク質の核内移行を視覚的に同定する方法が好ましい。

[0025] 本発明のCdc42タンパク質の核内移行促進剤は、医薬として血管障害の治療・予防に使用されるだけでなく、各種の細胞を用いた試験においてCdc42タンパク質を細胞の核内に局在させておきたいときの試薬として使用することもできる。即ち、医薬における有効成分として使用されるだけでなく、実験用の試薬や診断薬における試薬などとして使用することもできる。

[0026] 本発明の血管治療剤としては、前記した本発明のCdc42タンパク質の核内移行促進剤を用いるか、あるいは同核内移行促進剤と製薬学的に許容される担体とからなる血管治療用の医薬組成物が挙げられる。

[0027] 本発明の血管治療剤の投与経路としては、例えば錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等による経口投与、又は静脈内注射剤、筋肉内注射剤、坐剤、吸入剤、経皮吸収剤、点眼剤、点鼻剤等による非経口投与が挙げられる。

[0028] また、このような種々の剤型の医薬製剤を調製するには、この有効成分を単独で、又は他の薬学的に許容される賦形剤、結合剤、增量剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、嬌味剤、香料、被膜剤、担体、希釈剤等を1種又はそれ以上と適宜組み合わせて用いることができる。

[0029] 特に、HMG-CoA還元酵素阻害剤の投与経路としては経口投与が好ましい。経口投与用製剤の調製にあたっては、有効成分の安定性を考慮してpHを調整(特開平2-6406号、日本国特許第2,774,037号、WO97/23200号等。これらの文献を参考して本明細書に取り込む。)するのが好ましい。

[0030] これらの医薬の投与量は、患者の体重、年齢、性別、症状等によって異なるが、通常成人の場合、有効成分をイソプレノイド合成阻害剤及び/又はグラニルグラニル転移酵素阻害剤として、一日0.01～1000mg、特に0.1～100mgを、1回又は数回に分けて経口投与するのが好ましい。

[0031] 実施例

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこの実施例により何ら限定されるものではない。

実施例 1

[0032] GFPと所望のタンパク質との融合タンパク質を調製するための市販プラスミドpEGFP-C1の所定の位置に、Cdc42の翻訳領域の全領域をコードする遺伝子を導入して、GFP-Cdc42遺伝子を含有するプラスミドを構築した。

1×10 個のHUVECを6ウエルのプレートに播種した後、1夜EGM-2培地で培養した。この細胞に、フジネ6(Fugene6)を用いて、前記で調製したプラスミド構築物DNAを1ウエル当たり0.8 μg添加した。さらに21時間EGM-2培地で培養した後、GFPによる蛍光を蛍光顕微鏡で観察した結果を図1に示す。

一方、プラスミド構築物DNAを添加したHUVECの培養を開始してから6時間後に、ピタバスタチンを最終濃度が1 μMとなるように添加し、さらに静置して15時間培養

した細胞をプレパラート上に固定し、蛍光顕微鏡で観察した結果を図2に示す。さらに、この細胞を核染色色素ヘキストで染色した結果を図3に示す。

産業上の利用可能性

[0033] 本発明は、Cdc42タンパク質の核内移行促進剤に関するものであり、Cdc42タンパク質は、血管内皮細胞の増殖及びバリアー機能の回復、又エンドセリンのシグナル伝達に関与していることが知られており、又、血管収縮・拡張、炎症、血液凝固・線溶に関わる種々の遺伝子の発現調節を介して血管病の進展に重要な役割を果しているものであることから、本発明の薬剤は、各種の血管病の治療や予防のための医薬として産業上の極めて有用なものである。

また、本発明は、Cdc42タンパク質の核内への移行を測定することを特徴とする血管治療剤のスクリーニング方法を提供するものであり、血管病の新たな治療薬や予防薬を開発するための手法として産業上有用である。

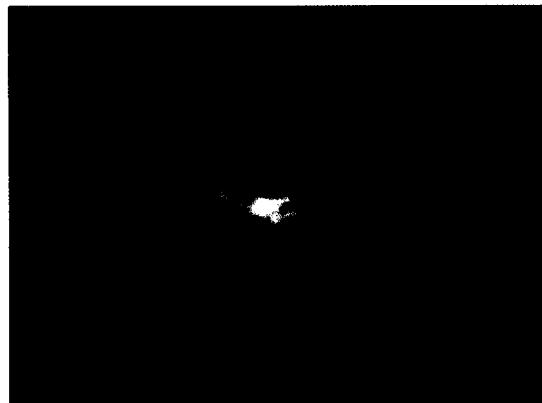
請求の範囲

- [1] イソプレノイド合成阻害剤及び／又はグラニルグラニル転移酵素阻害剤を含有してなる、Cdc42タンパク質の核内移行促進剤。
- [2] イソプレノイド合成阻害剤が、HMG-CoA合成酵素阻害剤、HMG-CoA還元酵素阻害剤、AMPK活性化剤又はファルネシルピロリン酸合成酵素剤である、請求の範囲第1項に記載のCdc42タンパク質の核内移行促進剤。
- [3] HMG-CoA還元酵素阻害剤がピタバスタチンである、請求の範囲第2項に記載のCdc42タンパク質の核内移行促進剤。
- [4] イソプレノイド合成阻害剤及び／又はグラニルグラニル転移酵素阻害剤のCdc42タンパク質の核内移行促進剤としての使用。
- [5] イソプレノイド合成阻害剤が、HMG-CoA合成酵素阻害剤、HMG-CoA還元酵素阻害剤、AMPK活性化剤又はファルネシルピロリン酸合成酵素剤である、請求の範囲第4項に記載のCdc42タンパク質の核内移行促進剤としての使用。
- [6] HMG-CoA還元酵素阻害剤がピタバスタチンである、請求の範囲第5項に記載のCdc42タンパク質の核内移行促進剤としての使用。
- [7] イソプレノイド合成阻害剤及び／又はグラニルグラニル転移酵素阻害剤を細胞に投与することからなる、Cdc42タンパク質の核内移行を促進させる方法。
- [8] イソプレノイド合成阻害剤が、HMG-CoA合成酵素阻害剤、HMG-CoA還元酵素阻害剤、AMPK活性化剤又はファルネシルピロリン酸合成酵素剤である、請求の範囲第7項に記載の方法。
- [9] HMG-CoA還元酵素阻害剤がピタバスタチンである、請求の範囲第8項に記載の方法。
- [10] 請求の範囲第1項～第3項のいずれかに記載のCdc42タンパク質の核内移行促進剤及び製薬上許容される担体を含有してなる血管治療用の医薬組成物。
- [11] 請求の範囲第1項～第3項のいずれかに記載のCdc42タンパク質の核内移行促進剤の血管治療剤の製造のための使用。
- [12] 治療・予防に有効量の請求の範囲第1項～第3項のいずれかに記載のCdc42タンパク質の核内移行促進剤を血管障害の予防・治療を必要とする患者に投与すること

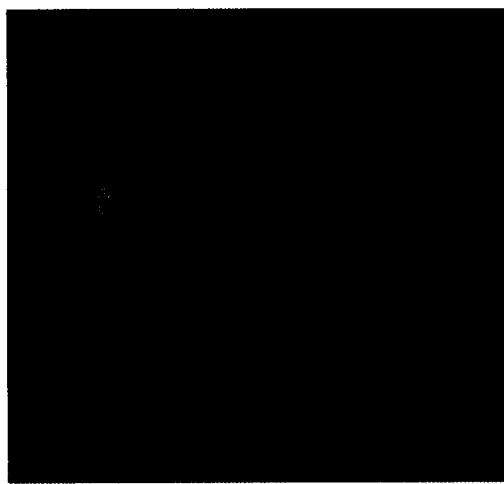
からなる血管障害の治療・予防方法。

- [13] Cdc42タンパク質を発現している細胞に被検物質を添加し、Cdc42タンパク質の核内への移行を測定することからなる血管治療剤のスクリーニング方法。
- [14] Cdc42タンパク質が蛍光蛋白質との融合タンパク質の形態である、請求の範囲第13項に記載のスクリーニング方法。
- [15] Cdc42タンパク質の核内への移行の測定が蛍光観察によるものである、請求の範囲第13項または第14項に記載のスクリーニング方法。

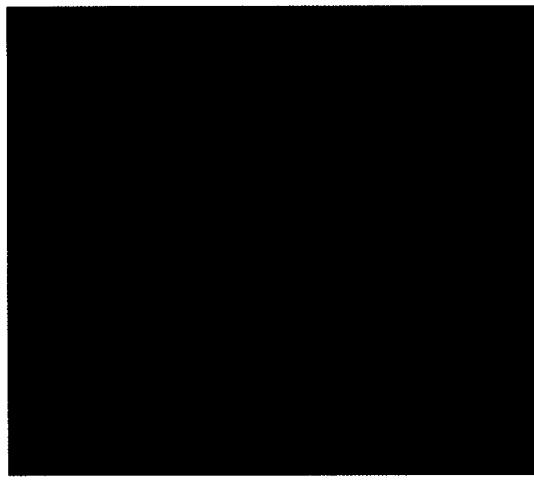
[図1]



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003008

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

 Int.Cl⁷ A61K45/00, A61K31/51, A61P9/10, A61P43/00, G01N33/15,
 G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

 Int.Cl⁷ A61K45/00, A61K31/51, A61P9/10, A61P43/00, G01N33/15,
 G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

 Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005
 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), WPI/DS (STN), JGTS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X A | MASAMURA, K. et al., 'PITAVASTATIN-INDUCED THROMBOMODULIN EXPRESSION BY ENDOTHELIAL CELLS ACTS VIA INHIBITION OF SMALL G PROTEINS OF THE RHO FAMILY.', ARTERIOSCLER.THROMB.VASC.BIOL., (2003), Vol.23, No.3, pages 512 to 517, full text, ABSTRACT, line 26 to 40 | 1-6,10,11 13-15 |
| X A | MORIKAWA, S. et al., 'THE EFFECT OF STATINS ON mRNA LEVELS OF GENES RELATED TO INFLAMMATION, COAGULATION, AND VASCULAR CONSTRUCTION IN HUVEC. HUMAN UMBILICAL VEIN ENDOTHELIAL CELLS.', J.ATHEROSCLER.THROMB., (2002), Vol.9, No.4, pages 178 to 183, full text, ABSTRACT, page 178, left column, lines 1 to 5, DISCUSSION | 1-6,10,11 13-15 |

 Further documents are listed in the continuation of Box C.

 See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

 Date of the actual completion of the international search
 24 May, 2005 (24.05.05)

 Date of mailing of the international search report
 07 June, 2005 (07.06.05)

 Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003008

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X A | MCCARTY, MF et al., 'REDUCTION OF SERUM C-REACTIVE PROTEIN BY STATIN THERAPY MAY REFLECT DECREASED ISOPRENYLATION OF RAC-1, A MEDIATOR OF THE IL-6 SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAY.', MED.HYPOTHESES, (2003), Vol.60, No.5, pages 634 to 639, full text, ABSTRACT | 1-6, 10, 11 13-15 |
| X A | BRANDES, RP et al., 'WITHDRAWAL OF CERIVASTATIN INDUCES MONOCYTE CHEMOATTRACTANT 1 AND TISSUE FACTOR EXPRESSION IN CULTURED VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS.', ARTERIOSCLER.THROMB.VASC.BIOL., (2003), Vol.23, No.10, pages 1794 to 1800, full text, ABSTRACT | 1-6, 10, 11 13-15 |
| X A | WAGNER, AH et al., 'IMPROVEMENT OF NITRIC OXIDE-DEPENDENT VASODILATATION BY HMG-COA REDUCTASE INHIBITORS THROUGH ATTENUATION OF ENDOTHELIAL SUPEROXIDE ANION FORMATION.', ARTERIOSCLER.THROMB.VASC.BIOL., (2000), Vol.20, No.1, pages 61 to 69, full text, ABSTRACT | 1-6, 10, 11 13-15 |
| X A | TAKEMOTO, M. et al., 'PLEIOTROPIC EFFECTS OF 3-HYDROXY-3-METHYLGLUTARYL COENZYME A REDUCTASE INHIBITORS.', ARTERIOSCLER.THROMB.VASC.BIOL., (2001), Vol.21, No.11, pages 1712 to 1719, full text | 1-6, 10, 11 13-15 |
| X A | ETO, M. et al., 'MODULATION OF COAGULATION AND FIBRINOLYTIC PATHWAYS BY STATINS.', ENDOTHELIUM, (2003), Vol.10, No.1, pages 35 to 41, full text | 1-6, 10, 11 13-15 |
| X A | MYSLIWIEC, M. et al., 'STATIN THERAPY-MORE THAN LIPID-LOWERING EFFECT.', ADVANCES IN CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE, (2003), Vol.12, No.2, pages 185 to 190, full text, ABSTRACT, particularly, page 186, left column, line 31 to right column, line 30 | 1-6, 10, 11 13-15 |
| X A | VECCHIONE, C. et al., 'WITHDRAWAL OF 3-HYDROXY-3-METHYL-GLUTARYL COENZYME A REDUCTASE INHIBITORS ELICITS OXIDATIVE STRESS AND INDUCES ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN MICE', CIRC.RES., (2002), Vol.91, No.2, pages 173 to 179, full text, ABSTRACT, page 173, left column, DISCUSSION | 1-6, 10, 11 13-15 |
| X A | DATABASE CAPLUS ON STN, (2002), ABSTRACT NO. 2002-323378 ABSTRACT & CEMERA, M. et al., 'CHOLESTEROL-INDUCED THROMBOGENICITY OF THE VESSEL WALL: INHIBITORY EFFECT OF FLUVASTATIN.', THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, (2002), Vol.87, No.4, pages 748 to 755 | 1-6, 10, 11 13-15 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003008

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 7-9, 12

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 7 to 9 and 12 involve embodiments concerning methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2) (a) (i) of the PCT

(continued to extra sheet)

2. Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003008

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

<Scope of search>

Claims 1, 4, 10 and 11 relate to a nuclear transfer promoter for Cdc42 protein which comprises, as the active ingredient, a compound defined as having desired properties, i.e., being "an isoprenoid synthesis inhibitor and/or a geranylgeranyl transferase inhibitor". Although these claims involve any compounds having the properties, only small part of the claimed compounds are supported in the meaning within PCT Article 6 and disclosed in the meaning within PCT Article 5.

Although the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, it is unclear what "an isoprenoid synthesis inhibitor and/or a geranylgeranyl transferase inhibitor" means. Namely, the scope of the compounds having these properties cannot be specified. Thus, the above claims do not comply with the requirement for clearness in the meaning within PCT Article 6 too.

Such being the case, the search was made mainly on the relation between pitavastatin or other statins, which are specifically employed as "an isoprenoid synthesis inhibitor and/or a geranylgeranyl transferase inhibitor" in the description, and the nuclear transfer of Cdc42 protein and blood vessel remedies comprising pitavastatin or other stains as the active ingredient.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl.⁷

A61K45/00, A61K31/51, A61P9/10, A61P43/00, G01N33/15, G01N33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl.⁷

A61K45/00, A61K31/51, A61P9/10, A61P43/00, G01N33/15, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

| | |
|-------------|------------|
| 日本国実用新案公報 | 1922-1996年 |
| 日本国公開実用新案公報 | 1971-2005年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1996-2005年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1994-2005年 |

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAPLUS(STN), BIOSIS(STN), MEDLINE(STN), EMBASE(STN), WPIDS(STN), JOIS

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| X | MASAMURA,K. ET AL. 'PITAVASTATIN-INDUCED THROMBOMODULIN EXPRESSION BY ENDOTHELIAL CELLS ACTS VIA INHIBITION OF SMALL G PROTEINS OF THE RHO FAMILY.' ARTERIOSCLER. THROMB. VASC. BIOL., (2003) VOL.23 NO.3 P.512-517 文献全体、ABSTRACT、第 26-40 行 | 1-6, 10, 11 |
| A | | 13-15 |

☒ C欄の続きにも文献が例挙されている。

☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24.05.2005

国際調査報告の発送日

07.6.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

大久保 元浩

4C 8828

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

| C (続き) 関連すると認められる文献 | | 関連する 請求の範囲の番号 |
|---------------------|---|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | |
| X | MORIKAWA, S. ET AL. 'THE EFFECT OF STATINS ON mRNA LEVELS OF GENES RELATED TO INFLAMMATION, COAGULATION, AND VASCULAR CONSTRUCTION IN HUVEC. HUMAN UMBILICAL VEIN ENDOTHELIAL CELLS.' J. ATHEROSCLER. THROMB., (2002) VOL.9 NO.4 P.178-183 文献全体、ABSTRACT、P.178 左欄第 1-5 行、DISCUSSION | 1-6, 10, 11 |
| A | | 13-15 |
| X | MCCARTY, MF ET AL. 'REDUCTION OF SERUM C-REACTIVE PROTEIN BY STATIN THERAPY MAY REFLECT DECREASED ISOPRENYLATION OF RAC-1, A MEDIATOR OF THE IL-6 SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAY.' MED. HYPOTHESES, (2003) VOL.60 NO.5 P.634-639 文献全体、ABSTRACT | 1-6, 10, 11 |
| A | | 13-15 |
| X | BRANDES, RP ET AL. 'WITHDRAWAL OF CERIVASTATIN INDUCES MONOCYTE CHEMOATTRACTANT 1 AND TISSUE FACTOR EXPRESSION IN CULTURED VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS.' ARTERIOSCLER. THROMB. VASC. BIOL., (2003) VOL.23 NO.10 P.1794-1800 文献全体、ABSTRACT | 1-6, 10, 11 |
| A | | 13-15 |
| X | WAGNER, AH ET AL. 'IMPROVEMENT OF NITRIC OXIDE-DEPENDENT VASODILATATION BY HMG-COA REDUCTASE INHIBITORS THROUGH ATTENUATION OF ENDOTHELIAL SUPEROXIDE ANION FORMATION.' ARTERIOSCLER. THROMB. VASC. BIOL., (2000) VOL.20 NO.1 P.61-69 文献全体、ABSTRACT | 1-6, 10, 11 |
| A | | 13-15 |
| X | TAKEMOTO, M. ET AL. 'PLEIOTROPIC EFFECTS OF 3-HYDROXY-3-METHYLGLUTARYL COENZYME A REDUCTASE INHIBITORS.' ARTERIOSCLER. THROMB. VASC. BIOL., (2001) VOL.21 NO.11 P.1712-1719 文献全体 | 1-6, 10, 11 |
| A | | 13-15 |
| X | ETO, M. ET AL. 'MODULATION OF COAGULATION AND FIBRINOLYTIC PATHWAYS BY STATINS.' ENDOTHELIUM, (2003) VOL.10 NO.1 P.35-41 文献全体 | 1-6, 10, 11 |
| A | | 13-15 |

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------------|--|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | |
| X | MYSLIWIEC, M. ET AL. 'STATIN THERAPY - MORE THAN LIPID - LOWERING EFFECT.' ADVANCES IN CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE, (2003) VOL.12 NO.2 P.185-190 文献全体、ABSTRACT、特に P.186 左欄第 31 行 - 右欄第 30 行 | 1-6, 10, 11 |
| A | | 13-15 |
| X | VECCHIONE, C. ET AL. 'WITHDRAWAL OF 3-HYDROXY-3-METHYL -GLUTARYL COENZYME A REDUCTASE INHIBITORS ELICITS OXIDATIVE STRESS AND INDUCES ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN MICE.' CIRC. RES., (2002) VOL.91 NO.2 P.173-179 文献全体、ABSTRACT、P.173 左欄、DISCUSSION | 1-6, 10, 11 |
| A | | 13-15 |
| X | DATABASE CAPLUS ON STN, (2002) ABSTRACT NO. 2002:323378 ABSTRACT & CAMERA, M. ET AL. 'CHOLESTEROL-INDUCED THROMBOGENICITY OF THE VESSEL WALL: INHIBITORY EFFECT OF FLUVASTATIN.' THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, (2002) VOL.87 NO.4 P.748-755 | 1-6, 10, 11 |
| A | | 13-15 |

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 7-9, 12 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
 請求の範囲 7-9, 12 は、治療による人体の処置方法に係る態様を含むものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iii)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあつた。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかつた。

< 調査の範囲について >

請求の範囲 1, 4, 10, 11は、「イソプレノイド合成阻害剤及び／又はグラニルグラニル転移酵素阻害剤」という所望の性質を有することにより定義された化合物を有効成分とするCdc42タンパク質の核内移行促進剤に関するものである。そして、各請求の範囲は、そのような性質を有するあらゆる化合物を包含するものであるが、PCT 6条の意味において裏付けられ、また、PCT 5条の意味において開示されているのは、クレームされた化合物のごくわずかな部分に過ぎない。

また、「イソプレノイド合成阻害剤及び／又はグラニルグラニル転移酵素阻害剤」である化合物とはどのような化合物をいうのか、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する化合物の範囲を特定できないから、上記各請求の範囲は、PCT 6条における明確性の要件も欠いている。

よって、調査は主として、明細書で「イソプレノイド合成阻害剤及び／又はグラニルグラニル転移酵素阻害剤」として具体的に採用されているピタバスタチンかもしくはその他のスタチン類と、Cdc42タンパク質の核内移行との関係について、及び、当該ピタバスタチンかもしくはその他のスタチン類を有効成分とする血管治療剤、について行った。